

構造生物物理研究室

Structural Biophysics Laboratory

主任研究員 宮野 雅 司

MIYANO, Masashi

当研究室の主たる研究分野は、脂質様物質を介した生体内のエネルギーや情報の流れをタンパク質の構造依存的に解釈することであり、この研究姿勢は生物学上の基礎科学を推進するだけでなく、医学や薬学分野への応用も視野に入れたものである。現在は脂質代謝と脂質メディエーター関連のタンパク質を対象としている。応用上極めて重要な脂質メディエーター受容体を含む膜タンパク質の構造研究を視野に入れており、可能なものについては発現精製を含めた構造決定に取り組んでいる。もう1つの研究分野は、効率的なタンパク質の結晶化に関する技術開発である。これは文部科学省の研究委託事業である“タンパク 3000 プロジェクト”にも寄与するもので、理研内外の組織と共同で行っている。

1. 脂質関連タンパク質の結晶構造の解明

(1) ロイコトリエン B₄12-水酸化酵素/15-ケトプロスタグランジン還元酵素の結晶学的研究 (堀^{*1}, 吾郷, 宮野, 清水^{*2})

ロイコトリエン B₄ (LTB₄) は、炎症反応において白血球や好酸球などを活性化する走化性因子である。白血球以外の組織で、LTB₄ の不活性化経路の初発酵素としてロイコトリエン B₄ 12-水酸化酵素が同定され、LTB₄ の12位の水酸基の酸化反応を触媒する。さらに、本酵素は15-ケトプロスタグランジン E₄ や15-ケトリポキシン A₄ の13位の二重結合の還元反応を触媒することにより、これらを不活性化することが最近明らかになった。つまり本酵素は脂質メディエーターの不活性化において、異なる部位の酸化と還元を担う多機能酵素として働いている。この分子機構を理解するために、本酵素の構造学的研究を行っている。本年度は、本酵素のアポ体、NADP⁺ 複合体、NADP⁺ および15-ケトプロスタグランジン E₂ との複合体、NADP⁺ およびインドメタシンとの複合体の結晶構造を明らかにした。NADP⁺ および15-ケトプロスタグランジン E₂ との複合体では、NADP⁺ の2'水酸基と結合水が15ケト基の酸素原子と水素結合を形成していた。この結果、15-ケトプロスタグランジン E₂ のエノール型が安定化されて13位炭素原子が求電子的になり、NADP⁺ のニコチンアミド環のC3位炭素から水素がヒドリド転移されることにより、還元反応が触媒されることを提唱した。さらに、サブユニット間のプロリンリッチ領域は左巻きポリプロリンリッチヘリックス構造をしており、SH3ドメインを含むタンパク質が結合することが示唆される。この結合により基質認識部位の構造が変化しうるので、生体内でSH3ドメインを含むタンパク質により本酵素が活性制御を受けている可能性を提唱した。

(2) 高度好熱菌由来長鎖脂肪酸アシルコエンザイム A 合成酵素の結晶構造解析による分子反応機構解明 (吾郷, 有井^{*3}, 久永^{*2}, 宮野)

脂肪酸代謝の最初の酵素である長鎖脂肪酸アシルコエンザイム A 合成酵素 (LC-FACS) の X 線結晶構造が高度好熱

菌 (*Thermus thermophilus* HB8) 由来のタンパク質を使って初めて当研究室によって明らかにされた。LC-FACS は長鎖脂肪酸、ATP、およびコエンザイム A (CoA) の3種類の基質から、長鎖脂肪酸アシル化 CoA、ピロリン酸、および AMP を生成する酵素である。結晶構造解析の結果から以下に示す反応機構が推測されている。反応速度論の結果から予想された Bi-Uni-Uni-Bi Ping-Pong 反応機構モデルが、ATP が結合し C 末端ドメインが開型構造変化を起こす過程、脂肪酸が結合し脂肪酸アシル化 AMP を形成する過程、CoA がタンパク質に結合し CoA とアシル化 AMP がアシル置換してアシル化 CoA が生成するとともにアシル化 CoA と AMP が開型構造となり酵素から乖離して完了するモデルを提案した。このモデルを酵素分子反応機構として明らかにするために、LC-FACS 反応を蛍光分光学的に追跡するとともに様々な変異体を作成した。その結果、LC-FACS が ATP 添加時にトリプトファンの蛍光スペクトルに変化を示すこと、ATP によりトリプトファンの蛍光が消光され分子全体の大きさがコンパクトになることが分かった。この結果は結晶構造から予測される結果を支持する。さらに詳細に検討するために、ATP との結合に関与するアミノ酸残基や脂肪酸との結合に関与するアミノ酸残基、また C 末端ドメインの開閉に関与するアミノ酸残基の変異体を作製した。

(3) 高度好熱菌由来リボース 5 リン酸異性化酵素の結晶構造解析による分子反応機構解明 (浜田^{*1}, 吾郷, 菅原, 宮野)

地上に生きているどの細胞にもあり、きわめてよく保存されているリボース 5 リン酸異性化酵素 (ribose 5-phosphate isomerase A: RpiA) は酸化的ペントースリン酸回路においてリボース 5 リン酸 (R5P) とリブロース 5 リン酸 (Ru5P) の可逆的な異性化を触媒する。また、Rpi は植物のカルビンサイクルにおいても R5P を Ru5P に変換する。我々は Rpi の極めて高い立体選択触媒機構を明らかにするために、高度好熱菌 (*Thermus thermophilus* HB8) 由来の Rpi のアポ型 (分解能 1.8 Å)、開環型の R5P との基質複合体 (分解能 2.0 Å)、および開環型のアラビノース 5 リン酸 (A5P)

との阻害剤複合体（分解能 1.7 Å）の X 線結晶構造解析を行った。

Rpi/R5P 複合体と Rpi/A5P 複合体の結晶構造では R5P と A5P は鏡像的な様式で活性部位に結合していた。Rpi/R5P 複合体の構造から、Rpi のグルタミン酸 (Glu108) が触媒塩基・酸として働くことで、R5P は *cis*-enediolate 中間体を經由して C2 から C1 ヘプロトン転移される機構を示した。さらに、Rpi のオキシアニオンホールが基質の異性化反応中間体で生じる C1 の水酸基の負電荷を、また、リジン (Lys99) が C2 の水酸基の負電荷を安定化する機構を示した。

(4) 病原性セリウス菌由来スフィンゴミエリン水解酵素の結晶構造解析（吾郷，津下^{*2}，宮野）

生体膜を構成する複合脂質の主要構成リン脂質の 1 つであるスフィンゴミエリンの分解産物であるセラミドは、二次情報伝達物質として細胞外からの情報伝達に関わることが知られている。また最近、セラミドは外傷性の神経細胞アポトーシスにも関わっていることが示唆されてきている。この分解に関わるスフィンゴミエリナーゼ (SMase) の中でもスフィンゴミエリナーゼ C (EC: 3.1.4.12) がスフィンゴミエリンを、セラミドとコリンリン酸に分解する活性を示す。病原性セリウス菌 (*Bacillus cereus*) 由来スフィンゴミエリン水解酵素 (sphingomyelinase: Bc-SMase) は、スフィンゴミエリナーゼ C 活性と溶血活性を示し、およそ 300 残基のアミノ酸からなる。また、Bc-SMase のアミノ酸配列は、他の細菌由来の SMase と高い相同性を示すと同時に、主に脳に分布し外傷性の神経細胞アポトーシスとの関連が指摘されているおよそ 650 残基のアミノ酸からなるヒト由来中性 SMase (N-SMase) の後半のアミノ酸配列と相同性を持つ。Bc-SMase の立体構造決定と基質認識機構の解明は、酵素活性とアミノ酸配列の相同性から、Bc-SMase と相同な基質認識機構を持つと推定される N-SMase の機能と構造の研究にも寄与すると考えられる。本年度は X 線結晶構造解析の手法により Bc-SMase の構造決定を行い、1.5 Å 分解能で初めてスフィンゴミエリナーゼの立体構造を明らかにした。

2. 結晶化を指向したタンパク質の大量発現精製法の研究

(1) G タンパク質共役型受容体の大量発現系構築と機能解析（堀^{*1}，宮野，清水（孝）^{*2}，石井^{*2}）

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の結晶化を行えるサンプル調製をするために、大量発現系の構築を行っている。本研究では、大腸菌無細胞系を用いてミリグラム単位での発現に既に成功しているが、発現タンパクは立体構造をとらない不活性体であった。この発現タンパクを巻き戻すことにより活性体を得ることも既に成功しているが、再現性の良い巻き戻し条件を検索することが困難であった。そこで、発現ホストから直接活性体を精製する戦略に変更し、研究を進めている。

本年度は、ロイコトリエン B₄ 受容体 (BLT1) および血小板活性化因子受容体の発現を行った。

(i) 大腸菌をホストとして、マルトース結合タンパク質融合タンパク質として発現させた。ウエスタンブロットで発現を確認した。今後、大腸菌タンパク合成系に最適化された DNA コドン配列を持つ人工遺伝子を合成し、発現量

向上を目指す。

(ii) 昆虫細胞を使った発現系を構築中である。

BLT1 の C 末領域の変異体の機能解析実験によって、変異体はリガンド結合による活性化後モリガンドであるロイコトリエン B₄ に対する親和性が下がらず、また活性化状態が野生型に比べて長く持続することが示された。一方、ウシ由来ロドプシンを鋳型にした BLT1 モデルによる構造機能推定の結果、この領域は BLT1 での両親媒性短ヘリックス 8 の領域であった。これらの結果から、C 末両親媒性短ヘリックス 8 の疎水性側鎖に変異を持つ変異 BLT1 では、C 末両親媒性短ヘリックス 8 と細胞膜との相互作用が弱くなることで、活性化後のリガンド親和性の低下や活性化状態からの回復の遅延が起こると推定し、両親媒性短ヘリックス 8 は G タンパク質の活性化に寄与しているばかりでなく、その活性化状態からの回復にも深く寄与していると提案した。

(2) ヒト脂肪細胞由来ロイシニアミノペプチダーゼの発現精製に関する研究（有井^{*3}，菅原，宮野；服部，辻本（細胞生化学研究室））

ヒト脂肪細胞由来ロイシニアミノペプチダーゼ (A-LAP) は Zn²⁺ 結合型金属メタロプロテアーゼであり、M1 ファミリーに共通で活性発現に不可欠な HEXXH(X)₁₈E モチーフを有している。A-LAP は生体内において小胞体内腔に局在し、その生理学的機能は MHC-I におけるペプチド抗原提示時のトリミングであるとの報告があった。本研究課題では A-LAP 反応機構を構造生物学的に明らかにするために、Sf9 細胞や大腸菌を用いた発現系の構築、精製、結晶化を試みた。Sf9 細胞の生産系では、野生型や His-tag 付きの A-LAP を発現精製し結晶化に供した。しかし現在のところ、結晶を得るに至っていない。大腸菌発現系では、野生型 A-LAP の発現が認められなかったため、活性に関係するアミノ酸残基に変異を導入した変異体を複数作製し大量発現系を構築し、その変異体の精製を試みている。

(3) ヒト由来カルシニューリンホモログスプロテイン (CHP) の精製結晶化に関する研究（菅原，若林^{*2}，宮野）

CHP は、細胞に普遍的に含まれ細胞内部の pH を調節する膜タンパク質である Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) に結合し、何らかの制御因子として働くことが示唆されている。NHE1 の CHP 結合配列部分のペプチド断片と CHP を大腸菌で発現させて得られた複合体試料について結晶化を行い、添加剤としてイットリウムを含む条件から分解能 4 Å を越える結晶が得られ、分解能の向上を目指し結晶化条件の最適化を行っているところである。

(4) intermedin の発現および精製、結晶化（堀^{*1}）

GPCR リガンドである intermedin の結晶化を行っている。本年度は、ペプチド合成によりサンプルを調製し結晶化を行ったが、結晶は得られていない。さらに、大腸菌による大量発現系を構築中である。GST 融合たんぱく質として発現に成功し、現在発現領域と精製条件の検討を行っている。

(5) 高等植物の受精における自己・非自己の認識の構造生物学的研究（井田^{*4}）

高等植物は自家受粉を防ぎ、種の保存と遺伝的多様性を保持するために自家不和合性を獲得してきた。自家不和合性は、1 遺伝子座の複対立遺伝子 (S 遺伝子) によって制御

されている。本研究では、高等植物の受精における自他認識機構を明らかにすることを目的に、雌しべ側の S-RNase と花粉側の SFB の相互作用を原子レベルでの解明を目指している。現在 Sf9 細胞を用いた発現系および大腸菌を用いた大量発現系の構築に取り組んでいる。雌しべ側の S-RNase については大腸菌を用いた大量発現系の構築に成功し、精製法の確立を行っている。花粉側の SFB については Sf9 細胞を用いた発現系の構築を行っている。

3. 膜タンパク質の結晶構造の解明

(1) 常温性ラン藻 *Cyanobacterium Synechocystis* CPP sp. 6803 由来光化学系 複合体の X 線結晶構造解析 (網中^{*5}, 菅原, 菓子野^{*2}, 宮野)

常温性ラン藻 *Cyanobacterium Synechocystis* CPP sp. 6803 由来の光合成系 複合体は分子量約 400 kDa で 21 種以上のポリペプチド鎖からなる膜タンパク質超分子複合体である。複合体中で最も大きな分子量を持つ CP47 ポリペプチドの C 末にヒスチジンタグをつけて高活性、高純度に単離精製された試料を用いて X 線結晶構造解析に向けた結晶化を行っている。試料は波長 530~600 nm の範囲外の光には不安定であるため、遮光結晶化トレイを作成し、当研究室で開発を行った自動結晶化観察装置を用いることにより、結晶化作業における試料の変性を防ぎ、非常に幅広い条件の結晶化スクリーニングを迅速に再現性良く行うことが可能となった。この結果、系 II 複合体の針状結晶と桿状結晶を得ることに成功した。現在、より高分解能が得られる結晶の作成に取り組んでいる。

4. タンパク質構造決定の効率化に関する技術に関する研究

構造ゲノミクスは、ゲノム解析による膨大な遺伝子情報の蓄積を受け、遺伝子産物であるタンパク質の立体構造情報を網羅的に集積することを目標にしている。タンパク質構造決定の 1 つの柱は X 線結晶構造解析であり、タンパク質の生産、結晶化、X 線回折データ収集、構造解析という過程を経て構造情報解析によって立体構造情報が創生・集積される。さまざまな生物種の多様なタンパク質を扱う構造ゲノミクスでは、多数の試料を効率よく処理していくため、各段階での技術開発が必要となる。当研究室では、横浜研究所ゲノム科学総合研究センターと並んでタンパク 3000 プロジェクトの網羅的構造解析中核機関である理研播磨研究所ハイスループットファクトリーと共同に必要な技術開発を行っている。

(1) 全自動タンパク質結晶化・観察システムの開発研究 (菅原, 宮野; 岡崎, 田中, 仲村, 桑井, Babayeba (結晶化チーム); 瀧尾 (発現精製チーム); 国島 (構造解析第 1 チーム); Tahirov (構造解析第 2 チーム); 油谷 (情報解析チーム))

構造ゲノミクスにおいて結晶化はボトルネックの 1 つである。商用結晶化ロボットや結晶化スクリーンキットなどのタンパク質結晶化技術の進歩を生かして、より多くのサンプルをより早く結晶化スクリーニングするため、結晶化から観察のデータ管理まで含めたハイスループット全自動結晶化・観察システムの開発とその統合化を進めている。本年度は昨年度に引き続き企業と開発した全自動結晶化観察

ロボット“TERA”の運用を行うとともに、現在の 1/5 の分注量となる極微量結晶化分注装置の開発、膨大な結晶化データ利用ツールとして、より効果的な結晶化戦略の判断を自動で行うソフトウェアの開発を開始した。本年度は約 360 試料について約 36 万条件の結晶化、約 400 万枚の結晶化ドロップ画像の撮影を行い、150 の試料の結晶の回折チェックを行った。

(2) タンパク質構造解析の研究支援ツールの開発研究 (高^{*2}, 金森^{*2}, 宮野, 菅原; 瀧尾 (発現精製チーム); 国島 (構造解析第 1 チーム); 油谷 (情報解析チーム))

タンパク質構造の大量解析事業によって作り出されるデータは、網羅的な実験の結果、有益な情報を含んでいる一方で、その量が非常に膨大であるため、そこに含まれる情報を取り出し有効に管理、使用していくためにはデータベースが必要である。高い拡張性をデータベースに付加するため、デンドリカル構造の動的モデルを持つハイスループットファクトリーデータベース (HTPF-DB) を構築し運用している。本年度は、おもに HTPF-DB を構成している回折 DB についてビームラインや迅速 X 線結晶評価装置、実験室回折装置からのデータの自動登録を行えるようにし、解析 DB についてはデータフォーマットの統一化を図り、データの投入を開始した。

^{*1} 基礎科学特別研究員, ^{*2} 共同研究員, ^{*3} 協力研究員, ^{*4} ジュニア・リサーチ・アソシエイト, ^{*5} 研修生

The structural biophysics laboratory focuses on the structure-based functional analysis of the enzymes and receptors related to lipid metabolism and lipid mediators, since they are not only of biological importance but are targets that have developed many the reapeutics for inflammation and immuno-malfuction. Another focus is to develop high-throughput technologies for SR protein crystallography including an integrated automated protein crystallization system, as an effort for the National Project on Protein Structural and Functional Analysis, Protein 3000.

1. Structure-based functional studies of proteins related to lipids and other

(1) Crystallographic study of leukotriene B₄12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase

The multi-functional leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase (LTB₄ 12-HD/PGR) is an essential enzyme for eicosanoid inactivation. It is involved in the metabolism of the E and F series of 15-oxo-prostaglandins (15-oxo-PGs), leukotriene B₄ (LTB₄) and 15-oxo-lipoxin A₄ (15-oxo-LXA₄). The crystal structures of the LTB₄ 12-HD/PGR, the binary complex structure with NADP⁺ and the ternary complex structure with NADP⁺ and 15-oxo-PGE₂ have been solved. The structures showed that the 15-oxo group forms hydrogen bonds with the 2'-hydroxyl group of nicotine amide ribose of NADP⁺ and a bound water molecule to stabilize the enolate intermediate during the reductase reaction. The electron deficient C13 atom of the conjugated enolate may be directly attacked by a hydride from the NADPH nicotine amide in a stereospecific manner. The structure also implies that a Src homology domain 3 (SH3 domain) may interact with the left-handed proline rich helix (PPII helix) at the dimer interface and regulate LTB₄ 12-HD/PGR

activity by disruption of the substrate binding pore where accommodates the ω -chain of the substrate.

(2) Analysis for reaction mechanism for long chain fatty acyl-CoA synthetase

The first crystal structures of a long chain fatty acyl-CoA synthetase (LC-FACS) including the complexes were determined in the laboratory. LC-FACS synthesizes long fatty acyl-CoA from long chain fatty acid, ATP, and CoA. Based on the crystal structures, the reaction mechanism of LC-FACS is proposed as Bi-Uni-Uni-Bi Ping-Pong mechanism in atomic detail. We tried to confirm the proposed reaction mechanism of LC-FACS with fluorophotometric analyses. The results were consistent with the proposed mechanism. To confirm the proposed mechanism further, we constructed various mutants of the amino residues which had been proposed to participate the ATP and/or fatty acid binding as well as the closed conformation stabilization.

(3) X-ray crystal structural study of ribose-5-phosphate isomerase

Ubiquitous ribose-5-phosphate isomerase (Rpi) catalyzes the reversible isomerization between ribulose-5-phosphate (Ru5P) and ribose-5-phosphate (R5P) in the oxidative pentose-phosphate cycle. Rpi also converts R5P to Ru5P in the Calvin cycle of photosynthetic organisms. To clarify the catalytic mechanism of the enzyme, we determined the high resolution crystal structures of Rpi from *Thermus thermophilus* HB8, in complex with the ring-opened form of substrate R5P and the open chain form of the C2-stereo-epimer inhibitor arabinose-5-phosphate (A5P) including the apo form. In the crystal structures of Rpi/R5P complex and Rpi/A5P complex, both R5P and A5P are bound in the active site in a mirror symmetry binding mode. The structure of Rpi/R5P reveals that Glu108 is the general base/acid for proton transfer between C2 and C1 of R5P, and the catalytic reaction proceeds via the *cis*-enediolate intermediate. Furthermore, we proposed that the oxyanion hole stabilizes the negative charge of the O1-oxygen atom in the intermediate and the side chain amine of Lys99 plays a role in the stabilization of the negative charge of the O2 oxygen as well.

(4) Crystallographic analysis of sphingomyelinase

Ceramide is one of the intrinsic lipid mediators. Sphingomyelinase (SMase) is responsible to produce ceramide from sphingomyelin, a component of plasma membrane. The amino acid sequence of sphingomyelinase from *Bacillus cereus* (*Bc*-SMase) is homologous not only with those of various bacterial SMases but also with the amino acid sequence of the last half of human neutral SMase. The first crystal structure of *Bc*-SMase is determined at 1.5 Å resolution.

2. Expression and purification of proteins for structural studies

(1) Expression system of GPCRs

Expression system of GPCRs has been constructed. In the year, we have tried the expressions of leukotriene B4 receptor 1 (BLT1) and platelet-activating factor receptor (PAFR) by *E. coli* and insect cell systems.

(2) X-ray crystal structure analysis of human adipocyte-derived leucine aminopeptidase

Human adipocyte-derived leucine aminopeptidase (A-LAP) belongs to the M1 family of a zinc-metallo-protease, which contains the consensus sequence HEXXH(X)₁₈E motif. A-LAP was reported to localize in endoplasmic reticulum and to be involved in generation of the Major histocompatibility complex (MHC) class I-binding peptides

by the N-terminal trimming of longer precursors. We have been trying to purify the recombinant protein from an Sf9 cell over-expression system and to construct large expression systems using *E. coli* cells.

(3) Human calcineurin homologous protein (CHP)

CHP binds Na⁺-H⁺-exchanger (NHE1) and regulates intracellular pH. We have been trying crystallization experiments for X-ray crystallographic analysis of the complex of CHP and NHE1 fragment. We have already obtained some crystals of CHP-NHE1 fragment complex beyond 4 Å resolution.

(4) Expression, purification and crystallization of intermedin

Crystallization of a synthetic intermedin-peptide has been attempted. GST-intermedin fusion protein has been successfully expressed in *E. coli*.

(5) Structural studies of self-incompatibility proteins in many bisexual flowering higher plants

Self-incompatibility in many bisexual flowering higher plants is a mechanism for avoiding self-fertilization through rejection of self and related pollen by the female organ (the pistil). The mechanism is controlled by highly polymorphic genes at the *S*-locus. Higher plant enables the pistil to distinguish between self and non-self pollen of the same species. We want to explicate the self-incompatibility mechanism. We try to purify a recombinant protein coded in *S*-locus using Sf9 cell expression system as well as to construct large expression systems using *E. coli*.

3. Structure-based functional study of membrane proteins

(1) Photosystem II from a Cyanobacterium *Synechocystis* CPP sp. 6803

Cyanobacterium *Synechocystis* CPP sp. 6803 has 400 kDa molecular weight and more than 21 polypeptides. We are trying crystallization experiments using a robotic system for X-ray crystallographic analysis of this supermacromolecular complex.

4. Development of technologies for structure determination of protein in a high throughput manner

(1) Technologies for protein crystallization

Protein crystallization is one of the major bottlenecks in protein X-ray crystallography. We crystallized a lot of protein samples by full-automatic crystallization and observation robot system "TERA", which we had developed and daily operated more than one year. In this year, the number of trials of crystallization and observed images using the dedicated more than 360 proteins are counted about 360 thousand and 4 million, respectively. One hundred fifty proteins had crystallized and checked the qualities of their X-ray diffractions from the TERA crystallization trials with multi-steps.

(2) Tools for information integration

A fully-integrated laboratory information management to determine a number of protein structures in high throughput manner is crucial due to huge and various information generated to be recorded, shared and utilized in the whole facility. Highthroughput Factory Database (HTPF-DB) is the database to manage and share the experimental information. The dynamic model with dendritic structure is adopted as a basic frame to endue the database with high flexibility and expansibility. In this year, X-ray diffraction DB and X-ray analysis DB has been mainly developed. We have already started to restore the several data set of X-ray diffraction experiments from the

beam-line directly.

Research Subjects and Members of Structural Biophysics Laboratory

1. Structure-based functional study of proteins related to lipids and other
2. Expression and purification of proteins for structural studies
3. Structure-based functional study of membrane proteins
4. Development of technologies for structure determination of protein in a high-throughput manner

Head

Dr. Masashi MIYANO

Members

Dr. Hideo AGO
Dr. Mitsuaki SUGAHARA
Dr. Keisuke HAMADA ^{*1}
Dr. Tetsuya HORI ^{*1}
Dr. Yasuhiro ARII ^{*2}

^{*1} Special Postdoctoral Researcher

^{*2} Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Masafumi TSUJIMOTO (Cellular Biochemistry Lab.)
Dr. Akira HATTORI (Cellular Biochemistry Lab.)
Mr. Nobuo OKAZAKI (Large Scale Protein Crystallization Team, Highthroughput Factory)
Mr. Tomoyuki TANAKA (Large Scale Protein Crystallization Team, Highthroughput Factory)
Mr. Yuki NAKAMURA (Large Scale Protein Crystallization Team, Highthroughput Factory)
Ms. Maki KUMEI (Large Scale Protein Crystallization Team, Highthroughput Factory)
Ms. Nigar BABAYEBA (Large Scale Protein Crystallization Team, Highthroughput Factory)
Dr. Kouji TAKIO (Large Scale Protein Production Team, Highthroughput Factory)
Dr. Naoki KUNISHIMA (Protein Crystal Structure Team 1, Highthroughput Factory)
Dr. Tahir H. TAHIROV (Protein Crystal Structure Team 2, Highthroughput Factory)
Dr. Katsuhide YUTANI (Protein Structural Information Team, Highthroughput Factory)

Visiting Members

Dr. Shuichiro GODA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)
Dr. Hiroshi HASHIMOTO (Grad. Sch. Int. Sci., Yoko-

hama City Univ.)

Ms. Yuko HISANAGA (Natl. Cardiovas. Cen.)

Mr. Koh IDA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Dr. Katsuaki INOUE (JASRI)

Dr. Tsuyoshi INOUE (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Mr. Daisuke IRIKURA (Harvard Med. Sch., USA)

Dr. Satoshi ISHII (Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)

Prof. So IWATA (Imp. Coll. London, UK)

Mr. Eiji KANAMORI (Hitachi Software Eng. Co., Ltd.)

Dr. Yoshihide KANAOKA (Harvard Med. Sch., USA)

Dr. Yasuhiro KASHINO (Grad. Sch. Sci., Himeji Inst. Tech.)

Dr. Naoki MOCHIZUKI (Natl. Cardiovas. Cen.)

Dr. Eiji NISHIBORI (Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Dr. Kazuto OKURA (Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

Prof. Toshihisa OSHIMA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

Prof. Makoto SAKATA (Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.)

Dr. Haruhiko SAKURABA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

Prof. Mamoru SATO (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Prof. Jian-Ren SHEN (Fac. Sci., Okayama Univ.)

Prof. Takao SHIMIZU (Grad. Sch. Med., Univ. Tokyo)

Dr. Toshiyuki SHIMIZU (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Hideyuki TAKA (Hitachi Software Eng. Co., Ltd.)

Dr. Hideaki TSUGE (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)

Dr. Yoshihiro URADE (Osaka Biosci. Inst.)

Dr. Shigeo WAKABAYASHI (Natl. Cardiovas. Cen.)

Prof. Yasushi YAMAMOTO (Fac. Sci., Okayama Univ.)

Trainees

Mr. Hiroki ADEGAWA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Ryota AMINAKA (Grad. Sch. Sci., Himeji Inst. Tech.)

Mr. Kyouhei ARITA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Ms. Chie ENDO (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Ms. Akiko HIRATA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Takuya HIRATA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Takahito IMAGAWA (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)

Mr. Ryushi KAWAKAMI (Grad. Sch. Eng., Univ. Tokushima)

Mr. Shigeyuki MOMOZAWA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

Mr. Masamichi NAGAE (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)

Mr. Hitoshi NAKAYAMA (Grad. Sch. Agric., Kyoto

Univ.)
Mr. Hidetoshi SHIBATA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)
Mr. Takashi SHIMADA (Grad. Sch. Int. Sci., Yokohama City Univ.)
Mr. Yasuhiro SHIMIZU (Fac. Eng., Univ. Tokushima)
Mr. Yasushi SUGIMOTO (Inst. Health Sci., Tokushima Bunri Univ.)
Mr. Kazunari YONEDA (Fac. Eng., Univ. Tokushima)

誌 上 発 表 Publications

[雑 誌]

(原 著 論 文) * 印 は 査 読 制 度 が あ る 論 文

- Sakuraba H., Tsuge H., Shimoya I., Kawakami R., Goda S., Kawarabayashi Y., Katunuma N., Ago H., Miyano M., and Ohshima T.: "The first crystal structure of archaeal aldolase", *J. Biol. Chem.* **278**, 10799–10806 (2003). *
- Okuno T., Ago H., Terawaki K., Miyano M., Shimizu T., and Yokomizo T.: "Helix 8 of the leukotriene B₄ receptor is required for the conformational change to the low affinity state after G-protein activation", *J. Biol. Chem.* **278**, 41500–41509 (2003). *
- Hamada K., Ago H., Sugahara M., Nodake Y., Kuramitsu S., and Miyano M.: "Oxyanion hole-stabilized stereospecific isomerization in ribose-5-phosphate isomerase (Rpi)", *J. Biol. Chem.* **278**, 49183–49190 (2003). *
- Inoue T., Irikura D., Okazaki N., Kinugasa S., Matsumura H., Uodome N., Yamamoto M., Kumasaka T., Miyano M., Kai Y., and Urade Y.: "Mechanism of metal activation of human hematopoietic prostaglandin D synthase", *Nat. Struct. Biol.* **10**, 291–296 (2003). *

(総 説)

- 菅原光明, 山本雅貴, 宮野雅司: "ハイスループットファクトリーとハイスループット結晶構造解析技術開発", *生物物理* **43**, 146–149 (2003).
- 宮野雅司, 菅原光明, 山本雅貴: "タンパク質の大規模結晶構造解析または, ハイスループットファクトリーということ", *日本結晶学会誌* **45**, 268–272 (2003).

(その他)

- 菅原光明, 仲村勇樹, 黒石千寿, 浮田陽子, 岡崎伸生, 桑井麻希, 田中智之, 小林正則, 高秀幸, 宮野雅司: "タンパク質結晶化の自動化の試み: タンパク質結晶をより理論的に進める道はあるのか?", *日本結晶成長学会誌* **30**, 395–397 (2003).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国 際 会 議 等)

- Kamiya N. and Shen J.: "Crystal structure analysis of photosystem II from *Synechococcus vulcanus* at BL41XU of SPring-8", SRRC 8th Users Meet. and Workshop on Application of Synchrotron Radiation in Biology, Hsinchu, Taiwan, Oct.–Nov. (2002).
- Miyano M.: "Crystal structure of rhodopsin, an atomic model of GPCR", 39th Karolinska Institutet Nobel Conf., Stockholm, Sweden, June (2003).

Yamamoto M., Ueno G., Ida K., Kanda H., Kumasaka T., Miyano M., and Ishikawa T.: "High throughput protein crystallography at RIKEN structural genomics beamlines", 8th Int. Conf. on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI 2003), (Stanford Synchrotron Radiation Laboratory and The Advanced Light Source), San Francisco, USA, Aug. (2003).

Adachi S., Inoue K., Oka T., Yagi N., Tanaka Y., Ishikawa T., and Shiro Y.: "Subnanosecond-resolved X-ray diffraction at the SPring-8 high flux beamline BL40XU", 8th Int. Conf. on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI 2003), (Stanford Synchrotron Radiation Laboratory and The Advanced Light Source), San Francisco, USA, Aug. (2003).

Hori T.: "Crystal structure of bovine rhodopsin: a model of GPCRs", RIKEN/BBSRC Joint Symp. on Japan-UK Membrane Protein Structure Biology, (RIKEN and BBSRC), Harima, Sept. (2003).

Miyano M.: "RIKEN Hightthroughput Factory: an integrated structural Genomics/Proteomics facility at SPring-8", Workshop France-Japan on Structural Genomics, Tokyo, Nov. (2003).

(国 内 会 議)

- 大塚ちかこ, 西村光広, 増井良治, 中川紀子, 菅原光明, 倉光成紀: "高度好熱菌 MutM 蛋白質の構造機能解析", 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト: 第1回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 7月 (2002).
- 若山純一, 田村巧, 井上勝晶, 岡俊彦, 八木直人, 岩本裕之: "Caged ATP 光分解にともなう筋収縮蛋白構造変化の超高速時分割 X 線回折", 第40回日本生物物理学会年会, 名古屋, 11月 (2002).
- 若山純一, 田村巧, 井上勝晶, 岡俊彦, 八木直人, 岩本裕之: "Caged ATP 光分解に伴う遅筋型収縮蛋白の構造変化の超高速時分割 X 線回折", 2003 年生体運動研究合同班会議, 福岡, 1月 (2003).
- 宮野雅司: "ポストゲノム研究における IPR 戦略: タンパク質研究を中心にして", 研究・技術計画学会第18回シンポジウム, 東京, 7月 (2003).
- 宮野雅司: "タンパク質結晶化の自動化の試み: タンパク質結晶をより理論的に進める道はあるか?", 第33回結晶成長国内会議 (NCCG-33), 吹田, 7–8月 (2003).
- 後藤勝, 近江理恵, 宮原郁子, 菅原光明, 広津建: "Argininosuccinate synthetase: Structure of enzyme-ATP-substrates and stereochemistry of the reaction", 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第2回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 8月 (2003).
- 大嶋紀安, 浮田陽子, Tahirov T. H., 稲垣栄二, 梶原康宏, 横山茂之, 倉光成紀, 宮野雅司, 瀧尾擴士: "Functional Analysis of 2-keto-3-deoxygluconate Kinase", 高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト第2回ストラクチュローム連携研究会, (理研), 播磨, 8月 (2003).
- 菅原光明, 村山和隆: "網羅的解析プログラム: X線結晶構造解析", タンパク 3000 プロジェクト公開シンポジウム, (文部科学省), 東京, 9月 (2003).
- 田村巧, 若山純一, 井上勝晶, 岡俊彦, 八木直人, 岩本裕之:

- “骨格筋張力発生に伴う細いフィラメント由来 X 線反射の 2 次元高速時分割測定”, 第 46 回日本神経化学学会年会・第 41 回日本生物物理学会年会合同年会, 新潟, 9 月 (2003).
- 宮野雅司, 菅原光明, 仲村勇樹, 黒石千寿, 浮田陽子, 岡崎伸生, 糸井麻希, 田中智之, 小林正則, 高秀幸: “SPring-8 におけるハイスループットファクトリーにおける結晶化の自動化と評価法について”, 日本学術振興会回折構造生物第 169 委員会公開講演会, 京都, 9 月 (2003).
- 頼永優, 堂前直, 松崎英樹, 黒石千寿, 宮野雅司, 瀧尾擴士: “*Pyrococcus horikoshii* OT3 ゲノムのタンパク質翻訳領域の検討”, 超好熱古細菌の構造ゲノミクスのためのワークショップ, (RIKEN HTPF), 播磨, 11 月 (2003).
- 大嶋紀安, 菅原眞由美, 前川圭美, 山下さおり, 宮野雅司, 瀧尾擴士: “ハイスループットファクトリーにおける好熱菌タンパクの機能解析”, 超好熱古細菌の構造ゲノミクスのためのワークショップ, (RIKEN HTPF), 播磨, 11 月 (2003).
- 黒石千寿, 浮田陽子, 頼永優, 都築千鶴, 瀧尾擴士, 宮野雅司: “好熱菌と超好熱菌の発現と精製について”, 超好熱古細菌の構造ゲノミクスのためのワークショップ, (RIKEN HTPF), 播磨, 11 月 (2003).
- 上野剛, 山本雅貴, 広瀬雷太, 井田孝, 神田浩幸, 宮野雅司, 熊坂崇, 石川哲也: “構造ゲノムビームラインの自動化 II”, 日本結晶学会平成 15 年度年会, 熊本, 12 月 (2003).
- 神谷信夫, 吾郷日出夫, 青山浩, 宮野雅司, 城宜嗣, 沈建仁: “*Thermosynechococcus vulcanus* 由来光化学系 II 膜蛋白質複合体の結晶構造解析”, 第 17 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, つくば, 1 月 (2004).
- 菅原光明, 宮野雅司: “ハイスループット蛋白質結晶化の試み”, 理研シンポジウム「第 1 回ケミカルバイオロジーシンポジウム」, 河口湖, 1 月 (2004).
- 浜田恵輔: “ユビキタスナリボース 5 リン酸異性化酵素の高い立体特異性を持つ触媒メカニズム”, 理研シンポジウム「理研構造生物 IX シンポジウム Part1. 脂質メディエーター関連タンパク質の生物学からその応用発展 Part2. 放射光構造生物の進展とさらなる飛躍を目指して」, 播磨, 1 月 (2004).
- 宮野雅司: “Structural studies of lipid-related proteins in structural biophysics laboratory”, 理研シンポジウム「理研構造生物 IX シンポジウム Part1. 脂質メディエーター関連タンパク質の生物学からその応用発展 Part2. 放射光構造生物の進展とさらなる飛躍を目指して」, 播磨, 1 月 (2004).
- 田村巧, 若山純一, 井上勝晶, 八木直人, 岩本裕之: “細いフィラメント活性化過程の 2 次元高速 X 線時分割解析”, 2004 年生体運動研究合同班会議, 東京, 1 月 (2004).
- 宮野雅司: “GPCR の構造: GPCR のモデルとしてロドプシンはどこまで有効か”, 第 22 回高峰カンファレンス, (三共生命科学研究振興財団), 東京, 2 月 (2004).
- 宮野雅司: “構造プロテオミクスとハイスループット技術の創薬プロテオミクスへのインパクト”, 日本薬学会第 124 年会, 大阪, 3 月 (2004).
- 宮野雅司: “ロドプシン: GPCR の活性化メカニズムモデルとして”, 徳島大学分子酵素学研究センターシンポジウム「X 線結晶構造解析によるタンパク質複合体構造機能の解析」, 徳島, 3 月 (2004).